

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2002-333446  
(P2002-333446A)

(43) 公開日 平成14年11月22日 (2002. 11. 22)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード* (参考)
G 0 1 N 33/547		G 0 1 N 33/547	4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
1/34		1/34	Z 4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	D
審査請求 未請求 請求項の数47 O L (全 16 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-138496(P2001-138496)

(71) 出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社  
神奈川県南足柄市中沼210番地

(22) 出願日 平成13年5月9日(2001.5.9)

(72) 発明者 猪股 弘子

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フ  
イルム株式会社内

(72) 発明者 小島 政芳

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フ  
イルム株式会社内

(74) 代理人 110000109

特許業務法人特許事務所サイクス (外3  
名)

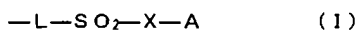
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的素材チップ

(57) 【要約】

【課題】 迅速かつ安定に結合固定可能な反応性固相担体に少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員が結合固定されてなる生物学的素材チップを提供すること。

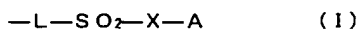
【解決手段】 特異的結合パートナーの一員の残基を有する下記式(1)で表される基が固相担体上に結合していることを特徴とする生物学的素材チップ。



【式(1)において、Lは、—SO<sub>2</sub>—X—Aと固相担体とを結合する連結基を示し；Xは、—CR<sup>1</sup>(R<sup>2</sup>)—CR<sup>3</sup>(R<sup>4</sup>)—を表し、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は互いに独立に、水素原子、炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数6乃至20のアリール基、又は炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基を表し；Aは、特異的結合パートナーの一員の残基を示す。】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 特異的結合パートナーの一員の残基を有する下記式(1)で表される基が固相担体上に結合していることを特徴とする生物学的素材チップ。



【式(1)において、Lは、 $\text{—SO}_2\text{—X—A}$ と固相担体とを結合する連結基を示し；Xは、 $\text{—CR}^1(\text{R}^2)\text{—CR}^3(\text{R}^4)\text{—}$ を表し、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 及び $\text{R}^4$ は互いに独立に、水素原子、炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数6乃至20のアリール基、又は炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基を表し；Aは、特異的結合パートナーの一員の残基を示す。】

【請求項2】 特異的結合パートナーが、生物学的な特異的結合を形成する構成員からなる、請求項1に記載の生物学的素材チップ。

【請求項3】 特異的結合パートナーが、抗体もしくは抗体フラグメントとリガンドとの組み合わせ、抗体もしくは抗体フラグメントと抗原との組み合わせ、抗体もしくは抗体フラグメントとハプテンとの組み合わせ、あるいはレセプターとリガンドとの組み合わせである、請求項1又は2に記載の生物学的素材チップ。

【請求項4】 特異的結合パートナーが、アビジン類とビオチン類との組み合わせである、請求項1に記載の生物学的素材チップ。

【請求項5】 アビジン類が、アビジン、ストレプトアビジン、またはビオチンと安定な複合体を形成しうるこれらの改変体である、請求項4に記載の生物学的素材チップ。

【請求項6】 ビオチン類がビチオン、ピオシチン、デスチオビオチン、オキシビオチン、またはアビジンと安定な複合体を形成しうるこれらの誘導体である、請求項4に記載の生物学的素材チップ。

【請求項7】 特異的結合パートナーが、核酸と核酸との組み合わせ、又は核酸と核酸結合物質との組み合わせである、請求項1に記載の生物学的素材チップ。

【請求項8】 核酸が、ヌクレオチド誘導体、ペプチド核酸、又はLNAである、請求項7に記載の生物学的素材チップ。

【請求項9】 核酸結合物質が2本鎖DNA認識物質である、請求項7に記載の生物学的素材チップ。

【請求項10】 2本鎖DNA認識物質が2本鎖DNA認識抗体である、請求項9に記載の生物学的素材チップ。

【請求項11】 2本鎖DNA認識物質がDNA転写因子である、請求項9に記載の生物学的素材チップ。

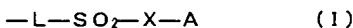
【請求項12】 2本鎖DNA認識物質が、Znフィンガーモチーフまたはリングフィンガーモチーフをもつタンパク質である、請求項9に記載の生物学的素材チップ。

【請求項13】 2本鎖DNA認識物質がペプチド核酸である、請求項9に記載の生物学的素材チップ。

【請求項14】 式(1)において、Aがタンパク質の残基を示す、請求項1に記載の生物学的素材チップ。

【請求項15】 固相担体がガラス、プラスチック、電極表面、又はセンサーチップ表面である、請求項1から14の何れかに記載の生物学的素材チップ。

【請求項16】 (a) 特異的結合パートナーの一員の残基を有する下記式(1)で表される基が固相担体上に結合していることを特徴とする生物学的素材チップと、特異的結合パートナーの他の一員である標的物質を含む試料とを接触させる工程；及び(b) 特異的結合パートナーの一員同士の相互作用を分析する工程；を含む、試料中の標的物質を検出する方法。



【式(1)において、Lは、 $\text{—SO}_2\text{—X—A}$ と固相担体とを結合する連結基を示し；Xは、 $\text{—CR}^1(\text{R}^2)\text{—CR}^3(\text{R}^4)\text{—}$ を表し、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 及び $\text{R}^4$ は互いに独立に、水素原子、炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数6乃至20のアリール基、又は炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基を表し；Aは、特異的結合パートナーの一員の残基を示す。】

【請求項17】 特異的結合パートナーが、生物学的な特異的結合を形成する構成員からなる、請求項16に記載の標的物質の検出方法。

【請求項18】 特異的結合パートナーが、抗体もしくは抗体フラグメントとリガンドとの組み合わせ、抗体もしくは抗体フラグメントと抗原との組み合わせ、抗体もしくは抗体フラグメントとハプテンとの組み合わせ、あるいはレセプターとリガンドとの組み合わせである、請求項16又は17に記載の標的物質の検出方法。

【請求項19】 特異的結合パートナーが、アビジン類とビオチン類との組み合わせである、請求項16に記載の標的物質の検出方法。

【請求項20】 アビジン類が、アビジン、ストレプトアビジン、またはビオチンと安定な複合体を形成しうるこれらの改変体である、請求項19に記載の標的物質の検出方法。

【請求項21】 ビオチン類がビチオン、ピオシチン、デスチオビオチン、オキシビオチン、またはアビジンと安定な複合体を形成しうるこれらの誘導体である、請求項19に記載の標的物質の検出方法。

【請求項22】 特異的結合パートナーが、核酸と核酸との組み合わせ、又は核酸と核酸結合物質との組み合わせである、請求項16に記載の標的物質の検出方法。

【請求項23】 核酸が、ヌクレオチド誘導体、ペプチド核酸、又はLNAである、請求項22に記載の標的物質の検出方法。

【請求項24】 核酸結合物質が2本鎖DNA認識物質

である、請求項 2 2 に記載の標的物質の検出方法。

【請求項 2 5】 2 本鎖 DNA 認識物質が 2 本鎖 DNA 認識抗体である、請求項 2 4 に記載の標的物質の検出方法。

【請求項 2 6】 2 本鎖 DNA 認識物質が DNA 転写因子である、請求項 2 4 に記載の標的物質の検出方法。

【請求項 2 7】 2 本鎖 DNA 認識物質が、Zn フィンガーモチーフまたはリングフィンガーモチーフをもつタンパク質である、請求項 2 4 に記載の標的物質の検出方法。

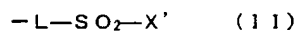
【請求項 2 8】 2 本鎖 DNA 認識物質がペプチド核酸である、請求項 2 4 に記載の標的物質の検出方法。

【請求項 2 9】 式 (1) において、A がタンパク質の残基を示す、請求項 1 6 に記載の標的物質の検出方法。

【請求項 3 0】 固相担体がガラス、プラスチック、電極表面、又はセンサーチップ表面である、請求項 1 6 から 2 9 の何れかに記載の標的物質の検出方法。

【請求項 3 1】 特異的結合パートナーの一員の残基を有する下記式 (1) で表される基が固相担体において、固相担体表面にあるフリーの反応性基がアミノ酸、ペプチドもしくはタンパク質水溶液でブロッキング処理されていることを特徴とする、請求項 1 6 から 2 0 の何れかに記載の標的物質の検出方法。

【請求項 3 2】 下記式 (1 1) で表されるビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基を表面に持つ固相担体上に、該ビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基と反応して共有結合を形成する反応性基を有する少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員を接触させることを含む、請求項 1 に記載の生物学的素材チップの製造方法。



【上記の式において、L は、 $-SO_2-X'$  と固相担体とを結合する連結基を示し； $X'$  は、 $-CR^1=CR^2(R^3)$  または  $-CH(R^1)-CR^2(R^3)(Y)$  を表し； $R^1$ 、 $R^2$  及び  $R^3$  は互いに独立に、水素原子、炭素原子数 1 乃至 6 のアルキル基、炭素原子数 6 乃至 20 のアリール基、又は炭素原子数 1 乃至 6 のアルキル鎖を有する合計炭素原子数 7 乃至 26 のアラルキル基を表し、Y は、求核試薬によって置換される基、あるいは塩基によって「HY」として脱離する基を表し； $R^{11}$  は、炭素原子数 1 乃至 6 のアルキル基、炭素原子数 6 乃至 20 のアリール基、又は炭素原子数 1 乃至 6 のアルキル鎖を有する合計炭素原子数 7 乃至 26 のアラルキル基を表し、 $R^{12}$  は、炭素原子数 1 乃至 6 のアルキル基又は炭素原子数 1 乃至 6 のハロゲン化アルキル基を表し、M は、水素原子、アルカリ金属原子又はアンモニウム基を表す。】

【請求項 3 3】 特異的結合パートナーが、生物学的な特異的結合を形成する構成員からなる、請求項 3 2 に記載の生物学的素材チップの製造方法。

【請求項 3 4】 特異的結合パートナーが、抗体もしくは抗体フラグメントとリガンドとの組み合わせ、抗体もしくは抗体フラグメントと抗原との組み合わせ、抗体もしくは抗体フラグメントとハプテンとの組み合わせ、あるいはレセプターとリガンドとの組み合わせである、請求項 3 2 又は 3 3 に記載の生物学的素材チップの製造方法。

【請求項 3 5】 特異的結合パートナーが、アビジン類とビオチン類との組み合わせである、請求項 3 2 に記載の生物学的素材チップの製造方法。

【請求項 3 6】 アビジン類が、アビジン、ストレプトアビジン、またはビオチンと安定な複合体を形成しうるこれらの改変体である、請求項 3 5 に記載の生物学的素材チップの製造方法。

【請求項 3 7】 ビオチン類がビチオン、ビオチン、デスチオビオチン、オキシビオチン、またはアビジンと安定な複合体を形成しうるこれらの誘導体である、請求項 3 5 に記載の生物学的素材チップの製造方法。

【請求項 3 8】 特異的結合パートナーが、核酸と核酸との組み合わせ、又は核酸と核酸結合物質との組み合わせである、請求項 3 2 に記載の生物学的素材チップの製造方法。

【請求項 3 9】 核酸が、ヌクレオチド誘導体、ペプチド核酸、又は LNA である、請求項 3 8 に記載の生物学的素材チップの製造方法。

【請求項 4 0】 核酸結合物質が 2 本鎖 DNA 認識物質である、請求項 3 8 に記載の生物学的素材チップの製造方法。

【請求項 4 1】 2 本鎖 DNA 認識物質が 2 本鎖 DNA 認識抗体である、請求項 4 0 に記載の生物学的素材チップの製造方法。

【請求項 4 2】 2 本鎖 DNA 認識物質が DNA 転写因子である、請求項 4 0 に記載の生物学的素材チップの製造方法。

【請求項 4 3】 2 本鎖 DNA 認識物質が、Zn フィンガーモチーフまたはリングフィンガーモチーフをもつタンパク質である、請求項 4 0 に記載の生物学的素材チップの製造方法。

【請求項 4 4】 2 本鎖 DNA 認識物質がペプチド核酸である、請求項 4 0 に記載の生物学的素材チップの製造方法。

【請求項 4 5】 固相担体に接触させる特異的結合パートナーの一員がタンパク質である、請求項 3 2 に記載の生物学的素材チップの製造方法。

【請求項 4 6】 固相担体がガラス、プラスチック、電極表面、又はセンサーチップ表面である、請求項 3 2 から 4 5 の何れかに記載の生物学的素材チップの製造方法。

【請求項 4 7】 固相担体上に少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員を接触させた後に、固相担体表面にあるフリーの反応性基をアミノ酸、ペプチドもしくは

タンパク質水溶液でブロッキング処理することを特徴とする、請求項32から46の何れかに記載の生物学的素材チップの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子の発現、変異、多型等の解析やプロテオミクス解析などに非常に有用であるDNAやタンパク質等の生物学的素材を固相表面に固定化したDNAまたはタンパクチップ等の生物学的素材チップ、その製造方法、並びに当該チップを用いた標的物質の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】多彩な生物の遺伝子機能を効率的に解析するための技術開発が急速に進んでおり、それらのDNAもしくはDNA断片の塩基配列の解析のために、DNAチップとよばれる、多数のDNA断片あるいは合成オリゴヌクレオチドなどのヌクレオチド誘導体を固相基板の表面に固定した検出用具が用いられている。このような固相基板の表面に結合固定されたヌクレオチド誘導体などの、DNAもしくはその断片あるいは合成オリゴヌクレオチドのような検出用分子はプローブ分子とも呼ばれる。代表的なDNAチップは、スライドガラス等の固相担体に多数のプローブ分子を整列固定させたマイクロアレイである。このDNAチップの製造、そしてその使用に関するDNAチップ関連技術は、DNA以外の生体分子の検出にも利用可能であると考えられ、従って、創薬研究、疾病の診断や予防法の開発等に新しい手段を提供するものとして期待されている。

【0003】DNAチップ関連技術が具体化してきたのは、DNAの塩基配列をオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって決定する方法が考案されたことに始まる。この方法は、ゲル電気泳動を用いる塩基配列決定法の限界を克服できる方法ではあったが、当初は実用化には至らなかった。

【0004】その後、上記のような構成のDNAチップと、その作製技術が開発され、遺伝子の発現、変異、多型等を短時間で効率よく調べることが可能となった。すなわち、作製されたDNAチップ上のDNA断片もしくはオリゴヌクレオチドに相補性を示すDNA断片試料

(標的DNA断片ともいわれる)は、一般的には、DNAチップ上のDNA断片もしくはオリゴヌクレオチドと、標識したDNA断片試料とのハイブリダイゼーションを利用して検出される。

【0005】DNAチップ作製技術を実用化するためには、多数のDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相担体表面に高密度に、かつ安定に整列させるための技術が必要とされる。

【0006】DNAチップの作製方法としては、固相担体表面で直接オリゴヌクレオチドを合成する方法(「オン・チップ法」という。)と、予め調製用意したDNA

断片あるいはオリゴヌクレオチドを固相担体表面に結合固定する方法とが知られている。オン・チップ法としては、光照射で選択的に除去される保護基の使用と、半導体製造に利用されるフォトリソグラフィ技術および固相合成技術とを組み合わせ、所定の微少なマトリックス領域でのオリゴヌクレオチドの選択的な合成を行なう方法(「マスキング技術」という)が代表的である。

【0007】予め調製用意したDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相担体表面に結合固定する方法としては、DNA断片の種類や固相担体の種類に応じて下記の方法が知られている。

(1) 固定するDNA断片がcDNA(mRNAを鋳型にして合成した相補的DNA)やPCR産物(cDNAをPCR法によって増幅させたDNA断片)である場合には、cDNAあるいはPCR産物を、DNAチップ作製装置に備えられたスポット装置により、ポリ陽イオン化合物(ポリリシン、ポリエチレンジアミン等)で表面処理した固相担体の表面に点着し、DNA断片の持つ電荷を利用して固相担体に静電結合させるのが一般的である。なお、固相担体表面の処理方法としては、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基等を有するシランカップリング剤を用いる方法も利用されている。このシランカップリング剤を用いた表面処理では、アミノ基、アルデヒド基等は、共有結合により固相担体表面に固定されるため、ポリ陽イオン化合物による表面処理の場合と比較して、安定に固相担体表面に固定される。

【0008】上記のDNA断片の電荷を利用する方法の変法として、アミノ基で修飾したPCR産物をSSC(標準食塩—クエン酸緩衝液)に懸濁させ、これをシリル化したスライドガラス表面に点着し、インキュベートした後、水素化ホウ素ナトリウムによる処理および加熱処理を順に行なう方法が報告されている。しかし、この固定方法では必ずしも充分なDNA断片の固定安定度が得られ難いという問題がある。DNAチップ技術では、検出限界が重要となる。そのため、固相担体表面に充分な量で(すなわち、高密度に)、かつ安定にDNA断片が結合固定することは、DNA断片プローブと標識した試料核酸断片とのハイブリダイゼーションの検出限界の向上に直接影響する。

【0009】(2) 固定するオリゴヌクレオチド(プローブ分子)が合成オリゴヌクレオチドである場合には、まず反応活性基を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、予め反応性基を形成させるように表面処理した固相担体表面に該オリゴヌクレオチドを点着して、該オリゴヌクレオチドを固相担体表面に共有結合により結合固定させる方法も知られている。例えば、表面にアミノ基を導入したスライドガラスに、PDC(p-フェニレンジイソチオシアネート)の存在下、アミノ基導入オリゴヌクレオチドを反応させる方法、および該スライドガラスに、アルデヒド基導入オリゴヌクレオチドを反応させる

方法が知られている。これらの二つの方法は、前記

(1) の DNA 断片の電荷を利用して静電結合により固定する方法と比べると、オリゴヌクレオチドが固相担体表面に安定に結合固定されるという利点がある。しかし、PDC を存在させる方法は、PDC とアミノ基導入オリゴヌクレオチドとの反応が遅く、またアルデヒド基導入オリゴヌクレオチドを用いる方法では、反応生成物であるシッフ塩基の安定性が低い（従って、加水分解が起こり易い）という問題点がある。

【0010】なお、近年、DNA チップのプローブ分子として、オリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド（合成されたオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド及び DNA 分子や DNA 断片、そして RNA 分子や RNA 断片をも包含する）の代りに、PNA（ペプチド核酸）と呼ばれるオリゴヌクレオチド類縁体を用いる技術も提唱されている。この PNA の固相基板へ共有結合により固定するための方法として、アビジンとビオチンとを組合わせて用いる方法も知られている（特開平 11-332595 号公報）。この公開公報には、固相基板として、表面プラズモン共鳴（SPR）バイオセンサを利用することの技術も記載されている。表面プラズモン共鳴バイオセンサ上にプローブ分子が固定された DNA チップを用いて、その表面にハイブリダイゼーションを介して結合固定された DNA 断片は、表面プラズモン共鳴現象を利用して検出することができる。

【0011】また、DNA チップの基板として、電荷結合素子（CCD）を用いることも知られている（Nucleic Acids Research, 1994, Vol. 22, No. 11, 2124-2125）。

【0012】特開平 4-228076 号公報（米国特許第 5387505 号明細書に対応）には、ビオチン分子を付けた標的 DNA を、アビジン分子を表面に固定した基体に結合させて、標的 DNA を分離する技術が記載されている。

【0013】特公平 7-43380 号公報（米国特許第 5094962 号明細書に対応）には、リガンド—受容体アッセイに用いる検出用具であって、表面に反応活性基を有する微孔質ポリマー粒子の表面に受容体分子を結合させた分析用具が記載されている。

【0014】一方、ゲノム解析もほぼ終わり、遺伝子情報の持つ意味を最終的に理解し、細胞の生命活動をシミュレートするために不可欠な情報を提供する「プロテオーム・プロテオミクス」研究が進められている。プロテオームとは、特定の細胞、器官、臓器の中で翻訳生産されているタンパク質の全セットを意味し、さらには化学構造、総量、発現時期、翻訳後修飾、集合体形成などの高次情報解析の研究分野のことを「プロテオミクス」と呼ぶ。

【0015】プロテオーム研究は、タンパク質のプロファイリング、タンパク質の同定・精密分析、相互作用ネ

ットワーク解析、プロテオームデータベースの構築からなり、それを生命科学研究への応用していくという分野である。

【0016】このうち、相互作用ネットワーク解析法としては、酵母 two-hybrid 法やファージディスプレイ法、アフィニティキャプチャーを利用した方法として免疫沈降法や BIA-MS 法、カラムスイッチング—質量分析法などが行われている（プロテオーム解析法、163—211、羊土社、2000）。以上に挙げた相互作用解析方法はいずれも、ハイスループット解析には至っていない。

【0017】Schreiber らにより、ハイスループットなタンパク質の相互作用解析のためのタンパク質マイクロアレイに関する報告がなされた（Science, 289, 1760—1763, 2000）。これは、アルデヒド基をもったスライドガラス上にタンパク質水溶液を点着し、BSA 溶液でブロッキング後、タンパク質溶液と反応させ蛍光スキャナーで検出するものである。この場合はアルデヒド基とアミノ基との反応生成物であるシッフ塩基の安定性が低い（通常、加水分解が起こり易い）という問題点を有する。

【0018】このほかタンパク質を固相に固定化される方法として、特公平 7-53108 号公報には、タンパク質の末端に疎水性のポリペプチドを導入して、固相に固定化する方法が記載されている。

【0019】特許 2922040 号には、プロテイン A 分子膜による抗体タンパク質を固定化する方法が記載されている。

【0020】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、迅速かつ安定に結合固定可能な反応性固相担体に少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員が結合固定されてなる生物学的素材チップを提供することを解決すべき課題とする。さらに本発明は、上記した生物学的素材チップを用いた特異的結合パートナーの他の一員である標的物質の検出方法を提供することを解決すべき課題とした。さらにまた本発明は、上記した生物学的素材チップの製造方法を提供することを解決すべき課題とした。

【0021】

【課題を解決するための手段】本発明者は上記課題を解決するために鋭意検討した結果、スルホニル基を介した共有結合により少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員を固相担体に結合した生物学的素材チップを作製した結果、迅速かつ安定に該特異的結合パートナーの一員を固相担体に結合でき、標的物質を効率的に検出できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0022】本発明の第 1 の側面によれば、特異的結合パートナーの一員の残基を有する下記式（1）で表される基が固相担体上に結合していることを特徴とする生物

学的素材チップが提供される。



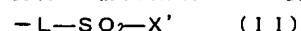
【式(1)において、Lは、 $\text{—SO}_2\text{—X—A}$ と固相担体とを結合する連結基を示し；Xは、 $\text{—CR}^1(\text{R}^2)\text{—CR}^3(\text{R}^4)\text{—}$ を表し、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 及び $\text{R}^4$ は互いに独立に、水素原子、炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数6乃至20のアリール基、又は炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基を表し；Aは、特異的結合パートナーの一員の残基を示す。】

【0023】本発明の第2の側面によれば、(a)特異的結合パートナーの一員の残基を有する下記式(1)で表される基が固相担体上に結合していることを特徴とする生物学的素材チップと、特異的結合パートナーの他の一員である標的物質を含む試料とを接触させる工程；及び(b)特異的結合パートナーの一員同士の相互作用を分析する工程；を含む、試料中の標的物質を検出する方法が提供される。



【式(1)において、Lは、 $\text{—SO}_2\text{—X—A}$ と固相担体とを結合する連結基を示し；Xは、 $\text{—CR}^1(\text{R}^2)\text{—CR}^3(\text{R}^4)\text{—}$ を表し、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 及び $\text{R}^4$ は互いに独立に、水素原子、炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数6乃至20のアリール基、又は炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基を表し；Aは、特異的結合パートナーの一員の残基を示す。】

【0024】本発明の第3の側面によれば、下記式(1)で表されるビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基を表面に持つ固相担体上に、該ビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基と反応して共有結合を形成する反応性基を有する少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員を接触させることを含む、上記した本発明の生物学的素材チップの製造方法が提供される。



【上記の式において、Lは、 $\text{—SO}_2\text{—X}'$ と固相担体とを結合する連結基を示し； $\text{X}'$ は、 $\text{—CR}^1=\text{CR}^2(\text{R}^3)$ または $\text{—CH}(\text{R}^1)\text{—CR}^2(\text{R}^3)(\text{Y})$ を表し； $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 及び $\text{R}^3$ は互いに独立に、水素原子、炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数6乃至20のアリール基、又は炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基を表し、Yは、求核試薬によって置換される基、あるいは塩基によって「HY」として脱離する基を表し； $\text{R}^{11}$ は、炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数6乃至20のアリール基、又は炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基を表し、 $\text{R}^{12}$ は、炭素原子数1乃至6のアルキル基又は炭素原子数1乃至6のハロゲン化アルキル基を表し、Mは、水素原子、アルカリ金属原子又はアンモニウム基を表

す。】

【0025】上記した本発明による生物学的素材チップ、該生物学的素材チップを用いて試料中の標的物質を検出する方法、並びに該生物学的素材チップの製造方法において、好ましい態様としては以下の態様が挙げられる。特異的結合パートナーが、生物学的な特異的結合を形成する構成員からなる態様；特異的結合パートナーが、抗体もしくは抗体フラグメントとリガンドとの組み合わせ、抗体もしくは抗体フラグメントと抗原との組み合わせ、抗体もしくは抗体フラグメントとハプテンとの組み合わせ、あるいはレセプターとリガンドとの組み合わせである態様；特異的結合パートナーが、アビジン類とビオチン類との組み合わせである態様；アビジン類が、アビジン、ストレプトアビジン、またはビオチンと安定な複合体を形成しうるこれらの改変体である態様；ビオチン類がビチオン、ピオシチン、デスチオビオチン、オキシビオチン、またはアビジンと安定な複合体を形成しうるこれらの誘導体である態様；

【0026】特異的結合パートナーが、核酸と核酸との組み合わせ、又は核酸と核酸結合物質との組み合わせである態様；核酸が、ヌクレオチド誘導体、ペプチド核酸、又はLNAである態様；核酸結合物質が2本鎖DNA認識物質である態様；2本鎖DNA認識物質が2本鎖DNA認識抗体である態様；2本鎖DNA認識物質がDNA転写因子である態様；2本鎖DNA認識物質が、Znフィンガーモチーフまたはリングフィンガーモチーフをもつタンパク質である態様；2本鎖DNA認識物質がペプチド核酸である態様；式(1)において、Aがタンパク質の残基を示す態様；固相担体がガラス、プラスチック、電極表面、又はセンサーチップ表面である態様；並びに固相担体上に少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員を接触させた後に、固相担体表面にあるフリーの反応性基をアミノ酸、ペプチドもしくはタンパク質水溶液でブロッキング処理する態様が挙げられる。

【発明の実施の形態】

【0027】本発明は、特異的結合パートナーの一員の残基を有する下記式(1)で表される基が固相担体上に結合していることを特徴とする生物学的素材チップに関するものである。



【式(1)において、Lは、 $\text{—SO}_2\text{—X—A}$ と固相担体とを結合する連結基を示し；Xは、 $\text{—CR}^1(\text{R}^2)\text{—CR}^3(\text{R}^4)\text{—}$ を表し、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 及び $\text{R}^4$ は互いに独立に、水素原子、炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数6乃至20のアリール基、又は炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基を表し；Aは、特異的結合パートナーの一員の残基を示す。】

【0028】本発明における特異的結合パートナーは、生物学的な特異的結合を形成する結合パートナーを意味

し、その種類は特に限定されるものでないが、抗体もしくは抗体フラグメント／リガンド、抗体もしくは抗体フラグメント／抗原、抗体もしくは抗体フラグメント／ハプテンなどの抗原決定基をもつもの、レセプター／リガンド、アビジン類／ビオチン類、核酸／核酸、核酸／核酸結合タンパク質等の組み合わせが挙げられる。本発明に従って作製されるDNAの固定化された固体支持体をDNAチップとして使用する場合には、一定の結合強度を有するためその後のハイブリダイゼーション操作に精度よく反復使用できるものである。

【0029】ビオチン類としては、ビオチン、ビオチン、デスチオビオチン、オキシビオチンまたはアビジンと安定な複合体を形成しうるこれらの誘導体が挙げられる。かような安定な複合体を形成しうるとは、ビオチン-アビジン複合体の解離定数 ( $10^{-15}$ M) に近似する解離定数を有する複合体を形成することができることを意味する。一方、アビジン類としては、アビジン、ストレプトアビジンまたはビオチンと安定な複合体を形成しうるこれらの改変体が挙げられる。ここにいう、「安定な複合体」の意味も、上記、ビオチン類について定義したのと同義である。また改変体とは、天然由来のアビジンまたはストレプトアビジンの修飾体もしくは断片、あるいはそれらの組換え体を意味する。

【0030】核酸としては特に限定されるものではないが、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体が挙げられる。代表例としては、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、そしてペプチド核酸を挙げることができる。これらのヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体としては、天然起源のもの (DNA、DNA断片、RNA、あるいはRNA断片など) であってもよく、あるいは合成化合物であってもよい。また、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体としては、その糖単位部分に架橋基を有するLNAと呼ばれる化合物 (J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 13252-13253に記載) などの各種の類縁化合物が含まれる。

【0031】核酸結合物質として特に限定されるものではないが、二本鎖DNA認識物質が挙げられる。二本鎖DNA認識物質としては、二本鎖DNAを認識し、特異的に結合する物質を示す。二本鎖DNA認識物質の具体例としては、DNA転写因子、ミスマッチ修復タンパク質、二本鎖DNA認識抗体、又はペプチド核酸などを挙げることができる。二本鎖認識物質としては、Znフィンガーモチーフまたはリングフィンガーモチーフを持つものが挙げられる。

【0032】DNA転写因子は、遺伝子上のプロモーター領域に結合して、DNAからmRNAへの転写を制御する物質である (田村隆明著: 転写因子 (羊土社 1995年))。従って、転写因子は特定の配列の二本鎖DNAに特異的に結合することが知られている。

【0033】多数ある転写因子のうち、Zinc Finger ProteinつまりZinc Finger

やRing Fingerモチーフをもつ転写因子群は、真核生物における出現率は非常に高く、ゲノム中の1%はこれをコードしているらしい。Pabo等はZinc Fingerモチーフの3次構造を解析、DNAと結合するメカニズムの解明した (Science, 252, 809 (1991))。さらに、Choo等は、遺伝子組換え法により、特定の配列に結合する自然界にはないZinc Finger Protein群を作製することに成功している (Nature 372, 642 [1994], PNAS91, 11163 (1994))。さらに、Scripps Research InstituteのグループはPhage Displayにより新規なZinc Finger Protein群の作製に成功している (PNAS95, 2812, [1998]: 96, 2758 (1999))。このように、Zinc Finger Proteinに代表されるDNA転写因子群は、本来2本鎖DNAと結合する性質をもっており、かつ近年の研究によれば、任意のDNA配列を認識する組換え体の作製も可能となってきた。このような、タンパク質を固定化することにより、2本鎖DNAを効率良く支持体上に捕捉することが可能である。

【0034】その他、核酸結合物質としてヘリックス・ループ・ヘリックスタンパク質やEtsドメインを持つものも挙げられる。

【0035】固相担体に固定する特異的結合パートナーの一員がタンパク質類である場合は、その内在するアミノ基もしくはメルカプト基、タンパク質にアミノ基、イミノ基、ヒドラジノ基、カルバモイル基、ヒドラジノカルボニル基、メルカプト基、もしくはカルボキシイミド基などを導入し、スルホニル基を介した反応性基と共有結合を形成する。

【0036】上記のタンパク質である特異的結合パートナーの一員 (例えば、抗体やアビジン類、核酸結合物質) が固定された固相担体は、水性媒体の存在下、該固定結合パートナーと特異的に反応する結合パートナーの他の一員 (例えばリガンドやビオチン類、核酸) と接触させて、その結合性パートナーを固定することができる。固定すべき特異的結合性の結合パートナーの他の一員 (例えばリガンドやビオチン類、核酸) はその固定を外部から検知することが可能なように検知可能な標識 (例、蛍光標識、酵素標識など) が結合していることが望ましい。

【0037】固相担体に固定されるのが核酸の場合のヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体の代表的な例としては、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド核酸およびLNAを挙げることができる。これらのヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体としては、その分子の一方の端部もしくは端部附近に、アミノ基、イミノ

基、ヒドラジノ基、カルバモイル基、ヒドラジノカルボニル基、もしくはカルボキシイミド基、メルカプト基などの、ビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基と反応する共有結合を形成する反応性基を持つものが利用される。

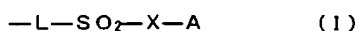
【0038】上記のヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体が固定された固相担体は、水性媒体の存在下、該固定ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体に対して相補性を示すオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド（DNAもしくはその断片、あるいはRNAもしくはその断片）を接触させて、ハイブリダイゼーションを発生させることにより、その相補性オリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドを固定することができる。固定すべき相補性のオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドは、その固定を外部から検知することが可能なように、検知可能な標識（例、蛍光標識）が結合していることが望ましい。

【0039】本発明で用いる固相担体としては、特異的結合パートナーの一員相互間の結合形成に悪影響を及ぼさないものであれば、その形状は、例えば、平板、マイクロウエル、ビーズ、スティック等のいずれをとることもできるが、それらの表面の性状は、特に疎水性、あるいは親水性の低い、表面が平滑な基板であることが好ましい。また、その表面が凹凸を有する平面性の低い基板も用いることができる。固相担体の材質としては、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックスもしくはニューセラミックス、ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー、シリコン、活性炭、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、多孔質活性炭、織編物、不織布、濾紙、短繊維、メンブレンフィルターなどの各種の多孔質物質を挙げることができる。多孔質物質の細孔の大きさは、2乃至1000nmの範囲にあることが好ましく、2乃至500nmの範囲にあることが特に好ましい。固相担体の材質は、ガラスもしくはシリコンであることが特に好ましい。これは、表面処理の容易さや電気化学的方法による解析の容易さによるものである。固相担体の厚さは、100乃至2000 $\mu$ mの範囲にあることが好ましい。また、操作の便宜上、固相担体は磁性体や電極の形態に加工されていてもよい。

【0040】固相担体として、電気化学的な分析方法に用いるDNAチップの基板として用いられる電極基板であってもよい。また、前述の表面プラズモン共鳴（SPR）バイオセンサ用基板、電荷結合素子（CCD）などの各種の機能性基板であってもよい。

【0041】本発明においては、生物学的素材チップの特異的結合パートナーの一員（下記の式（1）においては、Aで表される残基）は、下記式（1）で示す通りスルホニル基を介した共有結合により、固相担体に結合さ

れている。



【式（1）において、Lは、 $-SO_2-X-A$ と固相担体とを結合する連結基を示し；Xは、 $-CR^1(R^2)-CR^3(R^4)-$ を表し、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 及び $R^4$ は互いに独立に、水素原子、炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数6乃至20のアリール基、又は炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基を表し；Aは、特異的結合パートナーの一員の残基を示す。】

【0042】式（1）において、Lは、 $-SO_2-X-A$ と固相担体とを結合する二価もしくはそれ以上の連結基を示す。 $-L-$ の具体例としては、Lとしては、脂肪族、芳香族、ヘテロ環、ヘテロ原子で中断されていてもよい炭化水素鎖から選ばれる任意の連結基、さらにこれらの組み合わせから選ばれる連結基を用いることができ、また、Lは単結合であってもよい。

【0043】式（1）において、炭素原子数1乃至6のアルキル基の例としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、n-ブチル基、及びn-ヘキシル基を挙げることができ、メチル基であることが特に好ましい。炭素原子数6乃至20のアリール基の具体例としては、フェニル基及びナフチル基を挙げることができる。 $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ は共に水素原子であることが好ましい。炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基の例としては、上記した炭素原子数1乃至6のアルキル基の例と炭素原子数6乃至20のアリール基の例とを組み合わせたものが挙げられる。

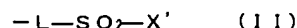
【0044】本発明はさらに、（a）特異的結合パートナーの一員の残基を有する上記式（1）で表される基が固相担体上に結合していることを特徴とする生物学的素材チップと、特異的結合パートナーの他の一員である標的物質を含む試料とを接触させる工程；及び（b）特異的結合パートナーの一員同士の相互作用を分析する工程；を含む、試料中の標的物質を検出する方法に関する。

【0045】本発明で用いる「標的物質を含む試料」の種類は特に制限されず、例えば、末梢静脈血のような血液、白血球、血清、尿、糞便、精液、唾液、培養細胞、各種臓器細胞のような組織細胞、その他核酸を含有する任意の試料を用いることができる。試料は上記のような組織細胞などの試料をそのまま使用してもよいが、好ましくは、試料中の細胞を破壊して核酸、リガンドなどを遊離させたものを試料として使用する。試料中の細胞の破壊は、常法により行うことができ、例えば、振とう、超音波等の物理的作用を外部から加えて行うことができる。また、核酸抽出溶液（例えば、SDS、Triton-X、Tween-20等の界面活性剤、又はサポニン、EDTA、プロテアーゼ等を含む溶液等）を用いて、細胞から核酸を遊離させることもできる。核酸抽出溶液を用いて核酸を



溶出する場合には、37℃以上の温度でインキュベートすることにより反応を促進することができる。

【0046】さらに本発明は、下記式(11)で表されるビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基を表面に持つ固相担体上に、該ビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基と反応して共有結合を形成する反応性基を有する少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員を接触させることを含む、本発明の生物学的素材チップの製造方法に関する。



【上記の式において、Lは、 $-SO_2-X'$ と固相担体とを結合する連結基を示し； $X'$ は、 $-CR^1=CR^2(R^3)$ または $-CH(R^1)-CR^2(R^3)(Y)$ を表し； $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ は互いに独立に、水素原子、炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数6乃至20のアリール基、又は炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基を表し、 $Y$ は、求核試薬によって置換される基、あるいは塩基によって「HY」として脱離する基を表し； $R^{11}$ は、炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数6乃至20のアリール基、又は炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基を表し、 $R^{12}$ は、炭素原子数1乃至6のアルキル基又は炭素原子数1乃至6のハロゲン化アルキル基を表し、 $M$ は、水素原子、アルカリ金属原子又はアンモニウム基を表す。]

【0047】式(11)において、炭素原子数1乃至6のアルキル基の例としては、メチル基、エチル基、 $n$ -プロピル基、 $n$ -ブチル基、及び $n$ -ヘキシル基を挙げることができる。炭素原子数6乃至20のアリール基の具体例としては、フェニル基及びナフチル基を挙げることができる。 $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ は共に水素原子であることが好ましい。炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基の例としては、上記した炭素原子数1乃至6のアルキル基の例と炭素原子数6乃至20のアリール基の例とを組み合わせたものが挙げられる。

【0048】式(11)において、 $Y$ は、 $-OH$ 、 $-O$

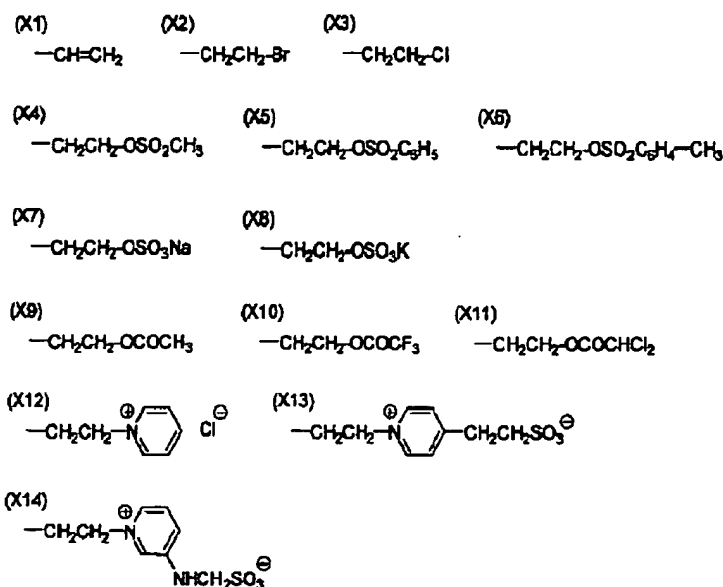
$R^0$ 、 $-SH$ 、 $NH_3$ 、 $NH_2R^0$ （但し、 $R^0$ は、水素原子を除く、アルキル基などの基である）などの求核試薬によって置換される基、あるいは塩基によって「HY」として脱離する基を表わし、その例としては、ハロゲン原子、 $-OSO_2R^{11}$ 、 $-OCOR^{12}$ 、 $-OSO_3M$ 、あるいは四級ピリジニウム基を表わす（ $R^{11}$ は、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、あるいは炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基を表わし； $R^{12}$ は、炭素原子数が1乃至6のアルキル基あるいは炭素原子数が1乃至6のハロゲン化アルキル基を表わし； $M$ は、水素原子、アルカリ金属原子あるいはアンモニウム基を表わす）を挙げることができる。

【0049】 $R^{11}$ のアルキル基、 $R^{11}$ のアリール基、および $R^{11}$ のアラルキル基は、置換基を持ってもよい。このような置換基としては、水酸基、炭素原子数が1乃至6のアルコキシ基、炭素原子数が1乃至6のアルケニル基、炭素原子数が2乃至7のカルバモイル基、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が7乃至16のアラルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、スルファモイル基（もしくはそのNa塩、K塩等）、スルホ基（もしくはそのNa塩、K塩等）、カルボン酸基（もしくはそのNa塩、K塩等）、ハロゲン原子、炭素原子数が1乃至6のアルケニレン基、炭素原子数が6乃至20のアリーレン基、スルホニル基、およびこれらの組み合わせからなる群より選ばれる原子もしくは基を挙げることができる。

【0050】式(11)において、Lは、 $-SO_2-X'$ と固相担体とを結合する二価もしくはそれ以上の連結基を示す。 $-L-$ の具体例としては、脂肪族、芳香族、ヘテロ環、ヘテロ原子で中断されていてもよい炭化水素鎖から選ばれる任意の連結基、さらにこれらの組み合わせから選ばれる連結基を用いることができ、また、Lは単結合であってもよい。上記「 $-X'$ 」基の好ましい具体例を以下に示す。

【0051】

【化1】



【0052】「-X'」は、上記具体例中、(X1)、(X2)、(X3)、(X4)、(X7)、(X8)、(X13)あるいは(X14)であることが好ましく、(X1)あるいは(X2)であることがさらに好ましい。特に好ましいのは、(X1)で表わされるビニル基である。

【0053】本発明で利用するスルホニル基を介した共有結合は、加水分解に対して高い抵抗性を有しているため、容易に安定に保存することができ、アミノ基を予め備えているか、あるいはアミノ基などの反応性基が導入されている、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体の反応性基と迅速に反応して、安定な共有結合を形成することができる。

【0054】オリゴヌクレオチドやDNA断片などのヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体の方の末端には、前記のビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基と反応して共有結合を形成する反応性基を導入する。このような反応性基は、アミノ基、イミノ基、ヒドラジノ基、カルバモイル基、ヒドラジノカルボニル基、もしくはカルボキシイミド基、メルカプト基であることが好ましく、アミノ基であることが特に好ましい。オリゴヌクレオチドやDNA断片には、通常、クロスリンカーを介してこれらの反応性基が結合される。クロスリンカーとしては、たとえば、アルキレン基あるいはN-アルキルアミノ-アルキレン基が利用されるが、ヘキシレン基あるいはN-メチルアミノ-ヘキシレン基であることが好ましく、ヘキシレン基であることが特に好ましい。なお、ペプチド核酸(PNA)はアミノ基を有しているため、通常は、改めて別に反応性基を導入する必要はない。

【0055】同様にタンパク質もアミノ基またはメルカプト基を有しているため通常は改めて別に反応性基を導入する必要はない。しかしながら、タンパク質の3次元

構造はその機能に大きく関与しているので、タンパク質の活性が低下する場合は活性とは関係のない特定の位置に反応基を導入することが好ましい。

【0056】反応性基を備えたヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体と反応性固相担体との接触は、通常、該ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体の水溶液を反応性固相担体の表面に点着することにより実施される。具体的には、反応性基を備えたヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体を水性媒体に溶解あるいは分散して水性液としたのち、その水性液を、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注し、分注した水性液をスポット装置等を用いて固相担体表面上に滴下して行うことが好ましい。

【0057】タンパク質を点着する場合は水性液の点着にはスポット装置を用いることもできるが、ピンヘッドの性状によってはタンパク質の活性を低下させる可能性もある。その場合は、インクジェット装置などを用いることが好ましい場合もありうる。

【0058】点着後のヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体の乾燥を防ぐために、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体が溶解あるいは分散してなる水性液中に、高沸点の物質を添加してもよい。高沸点の物質としては、点着後のヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体が溶解あるいは分散してなる水性液に溶解し得るものであって、検出対象の核酸断片試料(標的核酸断片)などの試料とのハイブリダイゼーションを妨げることがなく、かつ粘性があまり大きくない物質であることが好ましい。このような物質としては、グリセリン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシドおよび低分子の親水性ポリマーを挙げることができる。親水性ポリマーとしては、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、そしてポリアクリル酸ナトリウム等を挙げることができる。このポリマーの分子量は、 $10^3$ 乃至 $10^6$ の範囲に

あることが好ましい。高沸点の物質としては、グリセリンあるいはエチレングリコールを用いることがさらに好ましく、グリセリンを用いることが特に好ましい。高沸点の物質の濃度は、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体の水性液中、0.1乃至2容量%の範囲にあることが好ましく、0.5乃至1容量%の範囲にあることが特に好ましい。

【0059】点着後のタンパク質の乾燥及び変性を防ぐために、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体の場合と同様に高沸点の物質を添加してもよい。高沸点の物質の濃度は、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体の水性液中の濃度に特に規定はなく、点着後のタンパク質の活性によって調節してもよい。

【0060】また、同じ目的のために、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体、タンパク質などを点着した後の固相担体を、90%以上の湿度および25乃至50℃（タンパク質の場合は37℃まで）の温度範囲の環境に置くことも好ましい。

【0061】タンパク質、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体などの固定量（数）は、固相担体表面に対して、1乃至10<sup>5</sup>種類/cm<sup>2</sup>の範囲にあることが好ましい。点着によって、タンパク質、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体などの水性液は、固相担体表面にドットの形状で固定される。ドットの形状は、ほとんど円形である。それぞれのドット間の距離、大きさ、点着する際の水性液の容量はその用途によって変動する。

【0062】図1に、本発明の代表的態様であるタンパク質チップの構成を模式的に示す。

【0063】図1の固相担体（P1）の表面に反応性基（Z）を有するタンパク質Aを点着させると、Xとタンパク質との反応が起こるが、固相担体（P1）の表面には該タンパク質が結合していない未反応のXも存在する。このようなXは、後に行なわれる標識されたりリガンド等との反応において非特異的な反応を生じる可能性があり、非特異的な結合を測定してしまうおそれがあるため、予め該Xをブロッキング処理しておくことが好ましい。ブロッキング処理は、固相担体（P2）の表面に、アミノ基もしくはメルカプト基を有するものを接触させることによって行うことが好ましい。反応させるリガンドの非特異的な結合を防ぐためにはタンパク質ブロッキング剤、即ち、BSAやカゼイン、ゼラチンなどでブロッキング処理することが好ましい。そうすることで、点着されている部分以外の固相担体（P2）表面にはBSAなどが存在することとなり、リガンドが結合することができなくなる。また、核酸を反応させる場合には上記タンパク質ブロッキング剤のほかに、アミノ基またはメルカプト基を有するアニオン性化合物を接触させることによってブロッキング処理することができる。タンパク質と反応するものが核酸の場合は、核酸は負の電荷を有するため、固相担体（P2）表面にも負の電荷を発生さ

せることによって、核酸が未反応のXと反応するのを防ぐことができる。このようなアニオン性化合物としては、Xと反応し、かつ負の電荷（COO<sup>-</sup>、SO<sup>3-</sup>、OSO<sup>3-</sup>、PO<sup>3-</sup>、もしくはPO<sup>2-</sup>）を有するものであれば何れのものも用いることができるが、アミノ酸であることが好ましく、グリシンもしくはシステインであることが特に好ましい。また、タウリンも好ましく用いることができる。

【0064】本発明の代表的な態様であるタンパク質チップは、タンパク質相互作用解析、タンパク質発現解析、創薬研究に利用される。さらに、タンパク質が核酸結合タンパク質の場合は、その認識核酸配列によっては変異解析や多型解析に利用することができる。

【0065】検出原理は標識されたりリガンドや核酸との反応である。標識方法としてはRI法と非RI法（蛍光法、ビオチン法、化学発光法等）とが知られているが、とくに限定されるものではない。例えば蛍光法の場合、蛍光標識に利用される蛍光物質としては、核酸の塩基部分やタンパク質アミノ酸残基と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素（例えば、市販のCy Dye™シリーズのCy3、Cy5等）、ローダミン6G試薬、N-アセトキシ-N'-2-アセチルアミノフルオレン（AAF）あるいはAAIF（AAFのヨウ素誘導体）を使用することができる。

【0066】検体中の標的核酸は、PCR法などで増幅することなく直接検出するのが好ましいが、予め増幅したのちに検出してもよい。標的核酸またはその増幅体は、予め標識しておくことにより容易に検出可能である。核酸を標識するには、酵素（Reverse Transcriptase、DNA polymerase、RNA Polymerase、Terminal deoxynucleotidyl transferaseなど）を用いる方法がよく用いられるが、化学反応により、直接標識物質を結合させてもよい。このような標識方法については、公知の技術として成書に記載されている（野村慎太郎著 脱アイソトープ実験プロトコル1、秀潤社1994年、脱アイソトープ実験プロトコル2、秀潤社1998年、村松正明著 DNAマイクロアレイと最新PCR法標識物質 秀潤社2000年）。標識物質は、検出可能なシグナルを作ることの可能な物質であることが好ましい。標識物質が、酵素や触媒のような、シグナルの増幅能力のある物質である場合、DNAの検出感度は大きく向上する。

【0067】しかしながら、前述の標識操作は、一般的に煩雑であるので、さらに好ましい検出方法としては、検体中の核酸を予め標識せずに測定する方法を挙げることができる。これには、例えば2本鎖DNAを認識するDNA挿入剤、いわゆるDNAインターカレーターを用いることができる。DNAインターカレーターの使用により、検出操作が簡単になるだけでなく、検出感度も

向上する。例えば、1000bpのDNAを検出する場合、いわゆる標識法は多くとも数個の標識物質しか導入できないのであるが、インターカレーターを使用する場合は100個以上の標識物質を導入することが可能である。

【0068】DNAインターカレーターは、そのもの自体が検出可能なシグナルを形成できる物質であってもよいが、その側鎖にシグナル形成物質を結合していたり、ビオチン—アビジン、抗原—抗体、ハプテン—抗体のような特異結合対を介してインターカレーターに結合していてもよい。本発明における、検出可能なシグナルは、例えば、蛍光検出、発光検出、化学発光検出、生物発光検出、電気化学発光検出、放射能検出、電気化学検出、比色検出により検出可能なシグナルであることが好ましいが、これらに限定されるものではない。

【0069】リガンドが標的である場合は、内在しているアミノ基にシアニン色素（例えば、市販のCy Dye™シリーズのCy3、Cy5等）、ローダミン6G試薬、N—アセトキシ—N2—アセチルアミノフルオレン（AAF）あるいはAAIF（AAFのヨウ素誘導体）のサクシンイミド体を反応させたものを使用することができる。

【0070】ハイブリダイゼーションは、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注しておいた、標識した核酸断片試料が溶解あるいは分散してなる水性液を、本発明のヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体を固定した固相担体上に点着することによって実施することが好ましい。点着の量は、1乃至100nLの範囲にあることが好ましい。ハイブリダイゼーションは、室温乃至70℃の温度範囲で、そして1乃至20時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーションの終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の核酸断片試料を除去することが好ましい。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが特に好ましい。

【0071】ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体を固定した固相担体を用いるハイブリダイゼーションの特徴は、標識した核酸断片試料の使用量を非常に少なくできることである。そのため、固相担体に固定するヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体の鎖長や標識した核酸断片試料の種類により、ハイブリダイゼーションの最適条件を設定する必要がある。遺伝子発現の解析には、低発現の遺伝子も十分に検出できるように、長時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。一塩基変異の検出には、短時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。また、互いに異なる蛍光物質によって標識した核酸断片試料を二種類用意し、これらを同時にハ

イブリダイゼーションに用いることにより、同一のDNA断片固定固相担体上で発現量の比較や定量ができる特徴もある。本発明を以下の実施例により、さらに具体的に説明するが、これらの実施例は、本発明の理解を容易にするためのものであって、本発明をこれらに限定することを意図するものではない。

【0072】

【実施例】【実施例1】相補的な標的オリゴヌクレオチド試料の検出

（1）ビニルスルホン基が導入された固相担体の作成  
2質量%アミノプロピルエトキシシラン（信越化学工業（株）製）のエタノール溶液に、スライドガラス（25mm×75mm）を10分間浸した後、これを取り出し、エタノールで洗浄した後、110℃で10分間乾燥して、シラン化合物被覆スライド（A）を作成した。次に、このシラン化合物被覆スライドを、5質量%の1,2—ビス（ビニルスルホン）アセトアミドエタンのリン酸緩衝液（pH8.5）溶液に1時間浸した後取り出し、アセトニトリルで洗浄し、1時間減圧下乾燥し、表面にビニルスルホン基が導入された固相担体（B）を得た。

【0073】（2）オリゴヌクレオチド固定固相担体の作製

3'末端がアミノ基で修飾された40merのオリゴヌクレオチド（3'—TCCTCCATGTCGAGGAGGATCTGACACTTCAAGGTCTAG—5'）（配列番号1）を0.1M炭酸緩衝液（pH9.3）に分散してなる水性液（1×10<sup>-6</sup>M、1μL）を、実施例の（1）で得た固相担体（B）に点着した。直ちに、点着後の固相担体を25℃、湿度90%にて1時間放置した後、この固相担体を0.1質量% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）と2×SSC（2×SSC：SSCの原液を2倍に希釈した溶液、SSC：標準食塩—クエン酸緩衝液）との混合溶液で2回、0.2×SSC水溶液で1回順次洗浄した。次いで、上記の洗浄後のスライドを0.1Mグリシン水溶液（pH10）中に1時間30分浸漬した後、蒸留水で洗浄し、室温で乾燥させ、オリゴヌクレオチドが固定された固相担体（C）を得た。

【0074】（3）相補的な標的オリゴヌクレオチド試料の検出

5'末端にCy5（蛍光標識）が結合した22merの標的オリゴヌクレオチド試料（3'—CTAGTCTGTGAAGTTCCAGATC—5'）（配列番号2）をハイブリダイゼーション用溶液（4×SSCおよび10質量%のSDSの混合溶液、20μL）に分散させたものを、上記（1）で得た固相担体（C）に点着し、表面を顕微鏡用カバーガラスで保護した後、モイスチャーチャンバー内にて60℃で20時間インキュベートした。次いで、このものを0.1質量% SDSと2×SSC

Cとの混合溶液、0.1質量% SDSと0.2×SSCとの混合溶液、及び0.2×SSC水溶液で順次洗浄した後、700rpmで5分間遠心処理し、室温で乾燥した。スライドガラス表面の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定したところ、1219であり、バックグラウンド蛍光強度より大きく増加した。従って、本発明の固定化方法によって作製されたオリゴヌクレオチド固定固相担体を用いることによって、そのオリゴヌクレオチドと相補性を有する標的DNA断片試料などの標的オリゴヌクレオチド試料を効率的に検出できることが分かる。

#### 【0075】【実施例2】cDNAチップによる相補的cDNAの検出

##### (1) アミノ末端DNAの調製

pCR-Script™ SK (+)-α-2-HS-glycoproteinをテンプレートとして、5'末端にアミノ基が結合した20merプライマー(5'-TGGCGCGCTTCAACGCTCAG-3') (配列番号3)と24merプライマー(5'-GAAGGTGTGGCGCAGGTCGTAGTG-3') (配列番号4)を用いてPCRにより点着アミノ末端DNA (GP-NH<sub>2</sub>)を調製した。PCR条件は、Pyrobest DNA Polymeraseを用いて、94℃/20秒、60℃/30秒、72℃/30秒を30サイクル反応させた。PEサーマルサークル9700を用いた。同様のPCR条件で、pBlueScript II SK (+)-β-Actinをテンプレートとして、5'末端にアミノ基が結合した23merプライマー(5'-ATGGATGATGATATCGCGCGCT-3') (配列番号5)と24merプライマー(5'-GGTGAGGATCTTCATGAGGTAGTC-3') (配列番号6)を用いて点着アミノ末端DNA (Act-NH<sub>2</sub>)を調製した。

##### 【0076】(2) DNA固定固相担体の作製

GP-NH<sub>2</sub>とAct-NH<sub>2</sub>を0.1M炭酸緩衝液(pH9.3)に分散してなる水性液(1×10<sup>-6</sup>M、1nL)をスポッター装置を用いて、実施例1(1)で作製したビニルスルホニル基を表面に持つ固相担体に点着した。直ちに、点着後の固相担体を25℃、飽和食塩水チャンバーにて終夜放置した後、0.5Mグリシン水溶液(pH8.5)中に1時間浸漬した後、沸騰水中で30分間放置することで二本鎖を変性させて一本鎖とした。その後、氷冷エタノール中に浸漬することで変性を終了させ、室温で乾燥させ、cDNAが固定された固相担体(D)を得た。

##### 【0077】(3) 逆転写反応を用いた蛍光色素ラベル化cDNAターゲットの作製

in vitro transcriptionにより調製したGP-cRNAをテンプレートとし、22mer

rプライマー(5'-ACTGTGCGTGTTTTCCGGGGT-3') (配列番号7)を用いて逆転写反応によって蛍光色素ラベル化cDNAターゲットを調製した。2μg cRNA、20pmolプライマー、終濃度500μMのdATP、dGTP、dCTP、終濃度200μMのdTTP、終濃度100μMのCy5-dUTP (Amersham Pharmacia Biotech)をミックスし、DEPC-dH<sub>2</sub>O (Life Technologies)にて13μlにした。65℃で5分間インキュベートした後、氷上にて急冷した。そこに5×SuperScript II Buffer (Life Technologies)を4μl、RnaseOUT (Life Technologies)を1μl、0.1M DTTを2μl添加した。42℃にて2~3分間インキュベート後、SuperScript II逆転写酵素 (Life Technologies)を1μl添加し、42℃にて30分間インキュベートした。さらにSuperScript II逆転写酵素 (Life Technologies)を1μl添加して、42℃にて30分間インキュベートした。終濃度50mMのEDTAと0.2MのNaOHを添加し、65℃で15分間インキュベートした。1MのTris-HCl (pH7.5)にて中和後、アガロースゲル電気泳動で泳動した。蛍光スキャナー (FLA2000、富士写真フイルム)でゲルをスキャンし、Cy5標識ターゲット (GP-Cy5)の確認をした。

##### 【0078】(4) 相補的ターゲットcDNAのハイブリダイゼーション

1×10<sup>-6</sup>MターゲットcDNA (GP-Cy5)をハイブリダイゼーション用溶液(4×SSCおよび10質量%のSDSの混合溶液、20μL)に分散させたものを、上記(2)で得た固相担体(D)に点着し、表面を顕微鏡用カバーガラスで保護した後、モイスターチャンバー内にて60℃で20時間インキュベートした。次いで、このものを0.1質量% SDSと2×SSCとの混合溶液、0.1質量% SDSと0.2×SSCとの混合溶液、及び0.2×SSC水溶液で順次洗浄した後、700rpmで5分間遠心処理し、室温で乾燥した。スライドガラス表面の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定したところ、GP-NH<sub>2</sub>スポットでは337,000であり、バックグラウンド蛍光強度より大きく増加した。またネガティブコントロールであるAct-NH<sub>2</sub>スポットでの蛍光強度は39,000となり、有意にGP-NH<sub>2</sub>スポットではシグナルが増大していた。従って、本発明のスルホニル基を介してDNAを結合させたDNA固定固相担体を用いることによって、そのDNA固定固相担体に固定されているDNAと相補性を有するターゲットcDNA断片試料などの標的cDNA試料を効率的に検出できることが分かる。

##### 【0079】【実施例3】抗体固定化スライドによるリ

## ガンダの検出

### (1) 抗体の固定

Goat Anti Human IgG (Jackson ImmunoResearch) を PBS にて希釈し (100, 20, 4, 0.8, 0.16 ng/μL, 1 μL)、上記実施例 1 (1) に作製した固相担体 (B) に点着した。直ちに点着後の固相担体を 25°C、飽和食塩水チャンパーにて 3 時間放置した後、1% BSA/0.05% Tween 20-PBS (PBS-T) に 1 時間浸漬することでブロッキング処理し、抗体スライド (E) を得た。

### 【0080】(2) リガンドとの反応及び検出

上記 (1) で作製した抗体スライド (E) に Hybrid Well (Grace Bio-Labs) を密着させた。Human IgG-Cy5 (Jackson ImmunoResearch) を 1% BSA/PBS-T にて 2 μg/ml に希釈し、100 μL を Hybrid Well 内に添加後、モイスターチャンパー内にて 25°C で 1 時間インキュベートした。次いでこのものを、PBS-T で 3 回洗浄し、PBS でリンス後 700 rpm で 5 分間遠心処理することで乾燥させた。スライドガラス表面の蛍光強度を蛍光スキャン装置で測定したところ、100 ng/μL にて抗体をスポットした位置では 35.5 となりバックグラウンド蛍光強度より大きく増加した。従って、本発明のスルホニル基を介して抗体を結合させた抗体固定固相担体を用いることによって、その抗体固定固相担体に固定されている抗体と反応性を有するリガンドを効率的に検出できることが分かる

【0081】【実施例 4】オリゴヌクレオチド固定固相担体の作製、およびオリゴヌクレオチドの固定量の測定  
(1) ビニルスルホニル基が表面に固定された金電極の作成

表面をアセトンで洗浄した金電極 (表面積: 2.25 mm<sup>2</sup>) の表面に、11-アミノ-1-ウンデカチオールの水溶液 (1 mM) を 2 μL 滴下し、室温で水溶液が乾燥しないようにしながら 10 時間放置した後、蒸留水とエタノールとで電極表面を順次洗浄した。次いで、この金電極の表面に 3% の 1, 2-ビス (ビニルスルホニルアセトアミド) エタンを含むリン酸緩衝液 (pH 8.5) を 2 μL 滴下し、室温で 2 時間放置した後、蒸留水とエタノールとで電極表面を順次洗浄した。その後、1 時間減圧下に乾燥することにより、表面にビニルスルホニル基が連結基を介して結合した金電極を得た。

【0082】(2) オリゴヌクレオチドの固定 (電気化

## 学的分析素子の製造)

上記の (1) で得た表面にビニルスルホニル基を有する金電極に、5' 末端にアミノヘキシル基を導入したチミン 20 量体のオリゴヌクレオチド (T20) の水溶液 (100 ピコモル/1 μL) を 2 μL 滴下し、室温で 1 時間放置した後、余分なオリゴヌクレオチド (T20) を洗浄除去し、その後、乾燥することによって電気化学的分析素子を製造した。

【0083】(3) フェロセンラベル化オリゴヌクレオチドの調製

アデニンの 20 量体 (A20) の 5' 末端にアミノヘキシル基リンカーを結合させて、アミノヘキシル基結合オリゴヌクレオチドを得た。上記で得たアミノヘキシル基結合オリゴヌクレオチドを用いて、竹中等による Analytical Biochemistry, 218, 436-443 (1994) に記載されている方法に従い、5' 末端がフェロセンで標識されたアデニン 20 量体のオリゴヌクレオチド (F1-A20) を調製した。

【0084】(4) 相補的な標的オリゴヌクレオチド試料の検出

上記の (2) で作成した電気化学的分析素子の表面に、上記の 5' 末端がフェロセンで標識されたアデニン 20 量体のオリゴヌクレオチド (F1-A20) を含む 10 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) 溶液の 2 μL を滴下し、25°C で 30 分間インキュベートした。インキュベーションが終了したのち、分析素子の表面を純水にて洗浄し、未反応の化合物 F1-A20 を除去した。0.1 M 塩化カリウム-0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.60) 溶液を測定溶液 (38°C) として、100~700 mV の印加電圧範囲で、ディファレンシャル・パルス・ボルタメトリー (DVP) を行なったところ、460 mV の印加電圧において、化合物 F1-A20 に由来する応答電流が得られた。上記の操作と結果によって、オリゴヌクレオチドが金電極の表面に安定に結合固定され、この電極を用いて、電気化学的標識物質によって標識された、相補的な標的ヌクレオチド試料の検出が可能であることが確認された。

【0085】

【発明の効果】本発明により、迅速かつ安定に結合固定可能な反応性固相担体に少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員が結合固定されてなる生物学的素材チップを提供することが可能になった。

【0086】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Fuji Photo Film Co.Ltd.,  
<120> Biological material tips  
<130> A11193MA  
<160> 7

【0087】

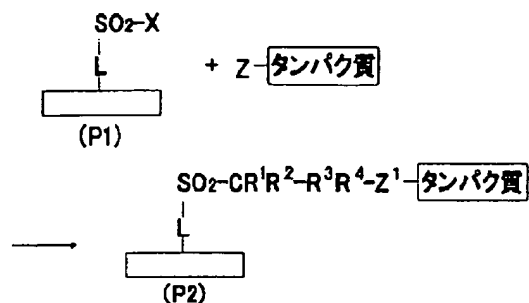
	<210> 1	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> Artificial DNA	
	<400> 1	
	tcctccatgt ccggggagga tctgacctt caaggtctag	40
【0088】		
	<210> 2	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial DNA	
	<400> 2	
	ctagtctgtg aagttccaga tc	22
【0089】		
	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial DNA	
	<400> 3	
	tggccgcctt caacgctcag	20
【0090】		
	<210> 4	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial DNA	
	<400> 4	
	gaaggtgtgg cgcaggtcgt agtg	24
【0091】		
	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial DNA	
	<400> 5	
	atggatgatg atatcgccgc gct	23
【0092】		
	<210> 6	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial DNA	
	<400> 6	
	ggtgaggatc ttcattgaggt agtc	24
【0093】		
	<210> 7	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial DNA	
	<400> 7	
	actgtgcgtg ttttcgggg gt	22

【図面の簡単な説明】

チップの構成の模式図である。

【図1】図1は、本発明の代表的態様であるタンパク質

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F 1	キーワード (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M U
		37/00	1 0 2
37/00	1 0 2	C 1 2 N 15/00	Z N A F
(72) 発明者 須藤 幸夫	埼玉県朝霞市泉水 3-11-46 富士写真フイルム株式会社内	(72) 発明者 瀬志本 修	埼玉県朝霞市泉水 3-11-46 富士写真フイルム株式会社内
(72) 発明者 篠木 浩	埼玉県朝霞市泉水 3-11-46 富士写真フイルム株式会社内	F ターム (参考)	4B024 AA11 CA04 CA09 HA13 HA14 HA19 4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 FA15 4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR55 QS34 QS39 QX02
(72) 発明者 岩木 義英	埼玉県朝霞市泉水 3-11-46 富士写真フイルム株式会社内		